

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

VERSUCHE ZUM NACHWEIS EINER DNA-POLYMERASE-AKTIVITÄT
IN ISOLIERTEN LEBER-MITOCHONDRIEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Monika Schmieder
aus Dresden

1968

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität

Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans H e r k e n

Versuche zum Nachweis einer DNA - Polymerase - Aktivität
in isolierten Leber-Mitochondrien

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Monika Schmieder
aus Dresden

Dekan: Professor Dr. med. Hans Heins Naumann

Referent: Professor Dr. med. Diether Neubert

Korreferent: Professor Dr. med. Helmut Coper



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 5. 11. 1968

Inhaltsübersicht

A Einleitung und Problemstellung

B Methodik

- I. Herstellung der Mitochondrien - Fraktion
- II. Isolierung der Kern - Fraktion
- III. Versuchsansatz
- IV. Versuchsanordnung
- V. Extraktion der RNA
- VI. Isolierung der DNA
- VII. Messung der radioaktiven Markierung
- VIII. Bestimmung der DNA

C Ergebnisse und Diskussion

- I. Einbau von dCMP-H³ in die DNA von Mitochondrien
- II. Einbau von TTP-H³ in die DNA von Mitochondrien
- III. Einbau von TTP-H³ durch nicht abgetrennte Kerne
 - 1.) Weitere Reinigung der Mitochondrien-Fraktion
 - 2.) Vergleich der spezifischen Aktivität in Mitochondrien und Zellkernen
 - 3.) Einfluß von DNase auf die Polymerase in Mitochondrien und Zellkernfraktionen
- IV. Eigenschaften der mitochondrialen DNA-Polymerase
 - 1.) Anwesenheit aller vier d-Nucleotide
 - 2.) Abhängigkeit von Co - Faktoren

3.) Hemmung der enzymatischen Reaktion durch
Antibiotica

V. Gegenüberstellung der DNA-Polymerase Aktivität
in Mitochondrien und Zellkernen

- 1.) Hemmung durch Antibiotica
- 2.) Einfluß von DNase
- 3.) Zeitliche Abhängigkeit der Einbaureaktion
- 4.) Einbau von Thymidin- H^3
- 5.) Beeinflussung der Einbaureaktion durch
 Mg^{++} und Mn^{++}

VI. Versuche zur näheren Charakterisierung der
DNA-Polymerase Aktivität in den Mitochondrien

D Z u s a m m e n f a s s u n g

E L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

A Einleitung

Nukleinsäuren sind Polynucleotide, die nach vollständiger Hydrolyse Purin- und Pyrimidin-Basen, Pentosen und Phosphat ergeben. Je nach der Art des Zuckers, ob Ribose oder Desoxyribose enthalten ist, unterscheidet man Ribonukleinsäuren (RNA) und Desoxyribonukleinsäuren (DNA).

Lange Zeit wurde angenommen, daß die DNA ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist.

Chevremont 1962; Schatz et al. 1964; Kroon 1965; Nass u. Nass 1965; Neubert 1965 machten die ersten Angaben darüber, daß auch im Cytoplasma von Hefe und einer Vielzahl von Warmblüterzellen, und zwar in den Mitochondrien lokalisiert, (Tewari et al. 1965; Wintersberger 1966; Carneio et al. 1966) kleine, aber sicher nachweisbare Mengen DNA vorhanden sind.

Neubert, Helge und Bass (1965) versuchten zu klären, ob die in den Mitochondrien enthaltene DNA in diesen Zellorganellen auch selbst gebildet wird. Ausgehend von dem autoradiographischen Hinweis, daß Thymidin offenbar in die Mitochondrien von Einzellern eingebaut wird (Plaut und Sagan 1958; Rabinovitch und Plaut 1962; Stone und Miller 1964; Guttes und Guttes 1964; Wollgiehn und Mothes 1964) verabfolgten sie Ratten radioaktiv markiertes Thymidin intravenös.

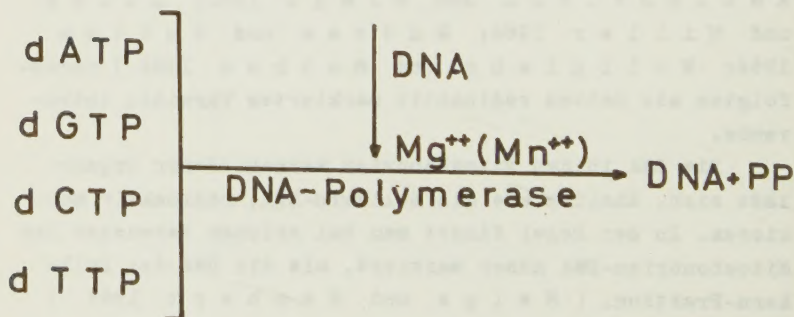
Die DNA in den Mitochondrien verschiedener Organe läßt sich, ähnlich wie die Zellkern-DNA, radioaktiv markieren. In der Regel findet man bei solchen Versuchen die Mitochondrien-DNA höher markiert, als die DNA der Zellkern-Fraktion. (Helge und Neubert 1965)

Eine Austauschreaktion oder unspezifische Adsorption wurde ausgeschlossen. (B a s s , H e l g e , N e u b e r t 1965)

In weiteren Untersuchungen über den Stoffwechsel der Mitochondrien- und der Zellkern- DNA wurde gefunden, daß die "Umsatzgeschwindigkeit" der DNA in beiden Fraktionen verschieden war: Bei gleichen Versuchsbedingungen fiel die spezifische Aktivität in den Mitochondrien von Lebern innerhalb von 7 Tagen auf die Hälfte ab. Im Vergleich dazu, betrug die "Halbwertszeit" für Zellkern-DNA mehr als 50 Tage. (N e u b e r t , B a s s , H e l g e 1966)

Alle diese Befunde sprechen dafür, daß die mitochondriale DNA einen von der Zellkern-DNA verschiedenen Stoffwechsel besitzt, und daß der gemessene Thymidin-Einbau eventuell eine DNS-Synthese repräsentiert. Das würde bedeuten, daß Mitochondrien über ein DNS- synthetisierendes System verfügen, das eine Replikation unabhängig von den entsprechenden Fermenten des Zellkerns durchführen kann.

Ein Ferment, das unter Benutzung von Desoxynucleosid Triphosphaten DNA synthetisiert, wird als DNA Polymerase bezeichnet. Hierbei dient bereits vorhandene DNA als Matrizie.



Ein solches Enzym wurde an Bakterien zuerst von Kornberg und seinen Mitarbeitern isoliert, und der Mechanismus seiner Wirkung aufgeklärt. (Kornberg 1957, Lehmann et al. 1958, Schachman et al. 1958)

Es wird vermutet, daß dieses Ferment das Schlüsselenzym darstellt bei der Weitergabe der genetischen Informationen von einer Zelle auf die Tochterzellen.

Nachdem an dem Vorhandensein mitochondrialer DNA kein Zweifel mehr bestand, haben wir versucht, eine DNA-Polymerase-Aktivität in isolierten Mitochondrien Präparationen nachzuweisen.

B Methode

Die Feststellung der Lokalisation der DNA - Polymerase innerhalb einer Zelle ist schwierig. Das Ferment, auch das im Zellkern, ist offenbar nur locker an den Zellkern gebunden, so daß es beim Homogenisieren und anschließenden Zentrifugieren leicht abgelöst wird und sich zu einem großen Teil im Hyaloplasma, also im löslichen Teil der Zelle, wiederfindet.

Allerdings scheint es nach neueren Untersuchungen fraglich, ob die DNA - Polymerase - Aktivität im Hyaloplasma tatsächlich aus dem Kern herausgetretene Aktivität darstellt (Neubert, Oberdisse, Schmieder, Reinsch, 1967).

Eine enzymatische Aktivität ist selbstverständlich nur dann messbar, wenn das Ferment und die DNS zusammen in einer Fraktion enthalten sind.

Für die Versuche wurden Albino - Ratten verschiedener Züchter im Gewicht von 70 g bis 200 g verwendet. Nach Dekapitation wurde die Leber in einem Kühlraum (+ 4°C) schnell herauspräpariert und sofort zur Isolierung der Zellfraktionen weiterverarbeitet.

1. Herstellung der Mitochondrien - Fraktion

Die Lebern wurden unter Zusatz von eiskalter Saccharose-Lösung (0,25 M Saccharose, 0,5 mM EDTA, 2 mM Tris - HCl, pH 7,4) in einem Homogenisator vom Potter - Elvehjem Typ (Potter und Elvehjem, 1936) zerkleinert. Durch Differentialzentrifugation in 0,25 M Saccharose-

Lösung wurden die Zellkern- und Mitochondrien-Fraktionen voneinander getrennt. Trotz zwei- bis dreimaliger Wiederholung der Zentrifugation bei 1 000 x g zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen, daß in der so gewonnenen Mitochondrien-fraktion noch Kernbruchstücke vorhanden waren (B a s s , 1967). Eine solche geringgradige "Verunreinigung" der Mitochondrien - Präparationen spielt für die meisten biochemischen Untersuchungen, wie zum Beispiel Messung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung, keine Rolle. Der Nachweis einer DNA - Polymerase - Aktivität in den Mitochondrien setzt aber Mitochondrienpräparationen voraus, die vollkommen frei von Verunreinigungen mit Zellkernen und Zelltrümmern sind. Die übliche Differential-zentrifugation genügt solchen Ansprüchen nicht.

Es wurde daher zusätzlich, nach Isolierung der üblichen Mitochondrien - Fraktion, eine Gradienten-zentrifugation im diskontinuierlichen Saccharose - Gradienten durchgeführt. Diese Methode wurde von Bass in unserem Institut entwickelt (B a s s , 1967).

Bei dieser Art der Herstellung wird das Mitochondrien - Sediment in 1,8 M Saccharose aufgenommen, unter einen diskontinuierlichen Saccharose Gradienten unterschichtet, und in einem SW 25 Rotor einer Spinco - Ultrazentrifuge zwei Stunden lang bei 24 000 rmp zentrifugiert. Dabei flotieren die Mitochondrien an die verschiedenen Grenzflächen, während die noch in der Präparation vorhandenen Zellkern - Verunreinigungen auf dem Boden des Röhrchens sedimentieren.

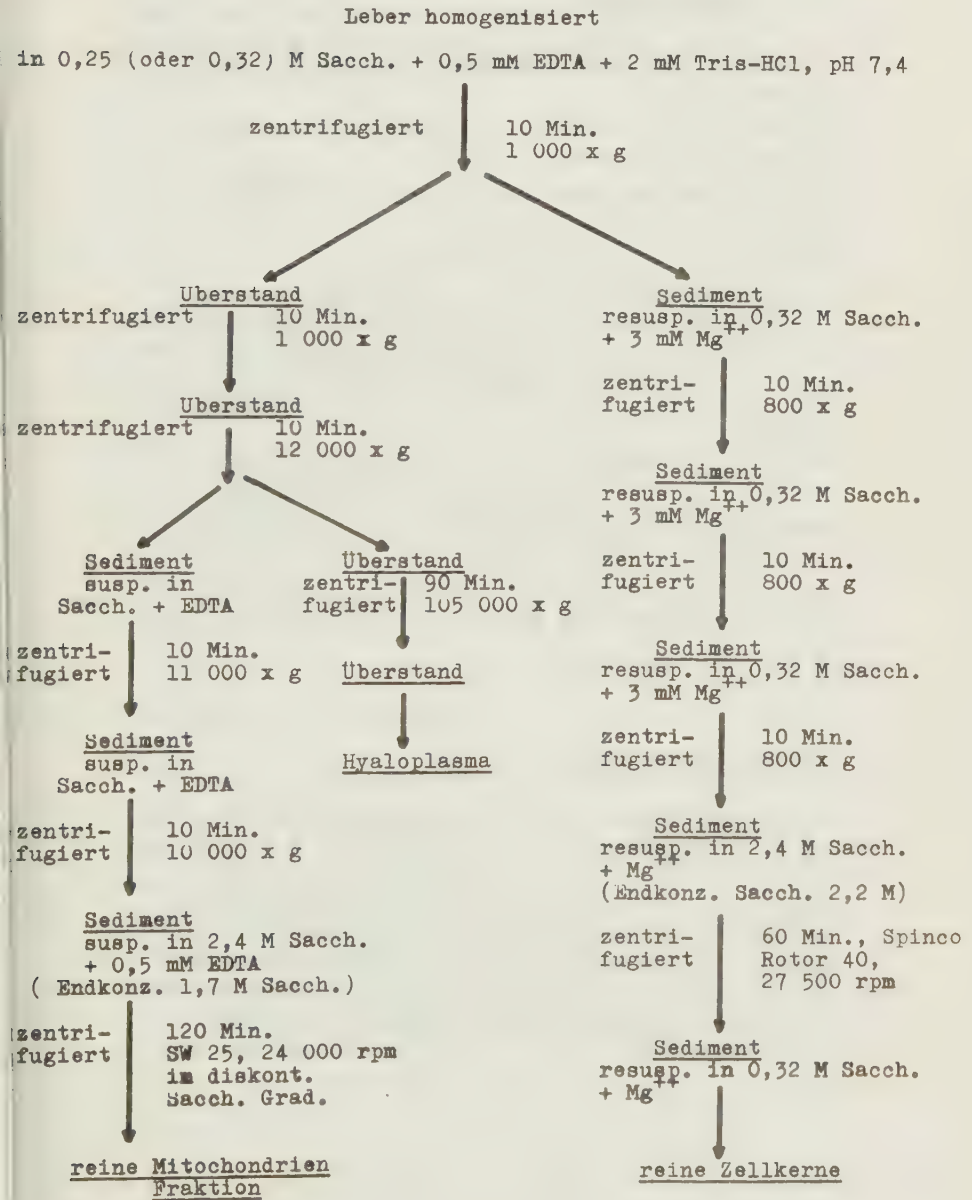
Für einige Versuche wurden die Mitochondrien durch Digitonin- oder Ultraschall- Behandlung fragmentiert.

Die " supernatant fraktion " wurde nach Frag -
mentierung der Mitochondrien und Abzentrifugieren
der Membranen in der Spinco - Ultrazentrifuge
(90 Minuten bei 100 000 - 200 000 x g) gewonnen.

II. Isolierung der Kernfraktion

Das Sediment der Zentrifugation bei 1 000 x g
wurde mit 0,25 M Saccharose (0,25 M Saccharose,
3 mM $MgCl_2$, 2 mM Tris - HCl, pH 7,4) aufgenommen,
und nach mehrmaligem Homogenisieren und Abzentrifugieren
daraus die "rohe" Zellkernfraktion isoliert.
Da sich auch hier elektronenmikroskopisch intakte
Zellen und Mitochondrien nachweisen ließen, wurde
die Zellkernfraktion nach der von W i d n e l l
und T a t a , 1964, angegebenen Methode in der
Modifizierung nach B a s s (1967) nochmals in
2,2 M Saccharose-Lösung eine Stunde lang in einer
Spinco-Ultrazentrifuge (Rotor 40, 27 500 rpm)
zentrifugiert. Die so gewonnenen Kernpräparationen
waren frei von Verunreinigungen (B a s s , 1967) .

Tabelle 1 Schema der verwandten Zellfraktionierung



III. Versuchsansatz

Die Versuchsansätze hatten folgende Zusammensetzung (1 ml) :

50 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 130 mM Tris-Puffer, pH 7,5.

Bei einigen Versuchen wurde anstelle von $MgCl_2$, $MnCl_2$ (2 mM) verwendet.

Die Ansätze enthielten weiterhin :

0,5 mM dATP, dGTP, dCTP, 1 mg Rinder-Serumalbumin (reinst), 1 mM ATP sowie 17 mM Phosphat-Puffer von pH 7,5. kurz vor der Inkubation wurden noch 8 mM GSH und als Precursor 20 μ C TTP- H^3 hinzugefügt.

Für einige Versuche wurde als radioaktiv markierte Vorstufe das für die DNA spezifische Thymidin-desoxyribosid benutzt, und zwar in einer Konzentration von 100 μ C Tdr/ml.

Die spezifische Aktivität des benutzten TTP- H^3 betrug 5 C/mmol. Das Tdr- H^3 hatte eine spezifische Aktivität von 6 C/mmol.

IV. Versuchsanordnung

Nach Zugabe von 0,2 ml Lebermitochondrien-Suspension pro Ansatz (0,3 - 1,5 mg N) wurden die Versuchsansätze in einem Wasserbad bei 37° C inkubiert. Nach bestimmten Zeiten (gewöhnlich 5, 10 und 15 Minuten) wurde die Reaktion durch Zusatz von 0,2 N eiskalter Perchlorsäure und 60 mM anorganischem Pyrophosphat " gestoppt ".

Durch Zugabe von etwa 3 mg Serumalbumin wurde der durch die Säure ausgefällte Niederschlag vermehrt. Das Präzipitat wurde dann fünfmal in der Kälte mit 0,2 N Perchlorsäure und 60 mM anorganischem Pyrophosphat " gewaschen "

V. Extraktion der RNA

Bei allen Versuchen wurde die RNA nach der von O g u r und R o s e n (1950) angegebenen Methode isoliert, um einen Einbau der radioaktiv markierten Vorstufe in die RNA (besonders bei Benutzung von dCMP-H³) auszuschließen. Die Extraktion erfolgte mit 1,0 N eiskalter Perchlorsäure in einer Schüttelapparatur über einen Zeitraum von 18 Stunden bei 0° C. In der durch Abzentrifugieren gewonnenen RNA-Fraktion ließ sich, abgesehen von den Versuchen mit dCMP-H³, niemals Radioaktivität nachweisen, so daß bei späteren Versuchen nur noch Stichproben durchgeführt wurden.

VI. Isolierung der DNA

Nach Extraktion der RNA wurde das säureunlösliche Sediment dreimal mit einem eiskalten Alkohol/Äther Gemisch (im Verhältnis 3 : 1) " gewaschen ". Die Waschprozedur wurde jeweils einmal mit eiskaltem Benzol und mit Äther fortgesetzt. Anschließend wurden die Versuchsansätze für 20 Minuten in einen Trockenschrank von 50° C gegeben, um die Reste des Äthers zu entfernen. Nach Zugabe von 2 ml 0,5 N Perchlorsäure pro Ansatz, wurde die DNA in einem Wasserbad bei 75° C (15 Minuten) extrahiert und in dem durch

Abzentrifugieren gewonnenen Überstand die spezifische Aktivität der DNA bestimmt. Eine Extraktion der DNA nach der Phenol-Methode (K i r b y , 1956) ergab die gleiche spezifische Aktivität.

VII. Messung der radioaktiven Markierung

Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Packard TRI-CARB Liquid Scintillation Counter, Modell 314 EX, gemessen.

Bei den Versuchen wurde die Zählausbeute nach Zugabe eines internen Standards (H^3 - Toluol) bestimmt und die IpM (Impulse pro Minute) entsprechend in ZpM (Zerfälle pro Minute) umgerechnet. Die Zählausbeute lag bei dem benutzten Scintillationsgemisch [4 g PPO/l (2,5 -Diphenyloxazol), 50 mg Pop/l (1,4- bis 2 (4- Methyl - 5 - Phenylloxazolyl) Benzol) in 8 ml Toluol und 6 ml Äthanol] und 0,5 ml wässriger Phase bei 7 %.

VIII. Bestimmung der DNA

Die DNA wurde nach der Methode von B u r t o n (1956) mit 3 %igem Diphenylamin in Gegenwart von Acetaldehyd bestimmt. Die Farbe wurde 18 Stunden bei Zimmertemperatur entwickelt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Extinktion bei den Wellenlängen : 625, 595 und 565 m μ ($2 \times E_{595} - (E_{565} + E_{625})$) um gleichzeitig vorliegende andere Substanzen, besonders bei der Bestimmung in Mitochondrien, auszuschließen.

C E r g e b n i s s e u n d D i s k u s s i o n

Es ist seit einiger Zeit bekannt, daß Mitochondrien eine kleine Menge DNA enthalten, die sich in vivo mit radioaktivem Thymidin markieren läßt. Auch in ihrer Stabilität läßt sich die Mitochondrien - DNA klar von der Zellkern - DNA abgrenzen. Wir vermuteten daher, daß in den Mitochondrien eine DNA - Polymerase lokalisiert ist und versuchten, diese enzymatische Reaktion mit hochgereinigten, isolierten Mitochondrien in vitro nachzuweisen.

I. Einbau von dCMP - H^3 in die DNA von Mitochondrien

Die ersten Versuche haben wir mit Tritium markiertem dCMP durchgeführt, da diese Substanz wesentlich billiger ist als die markierten Triphosphate. Mit isolierten Mitochondrien läßt sich in Gegenwart aller anderen in der DNA zu erwartenden Nucleotide, die als nicht markierte Triphosphate vorlagen, ein Einbau der Radioaktivität aus dCMP - H^3 in die mitochondriale DNA - Fraktion nachweisen.

Trotz mehrmaligen "Waschens" der Versuchsansätze mit 10 %iger Perchlorsäure fand sich in der isolierten RNA ebenfalls regelmäßig eine gewisse Aktivität, wie aus Tabelle 2 hervorgeht.

Tab. 2

Einbau von dCMP - H^3 in die DNA isolierter Mitochondrien

(ZPM/Ansatz)

Inkubations- Zeit	1. RNA Extraktion mit 10 % $HClO_4$	2. RNA Extraktion mit 10 % $HClO_4$	1. DNA Extraktion mit 5 % $HClO_4$
0'	150	41	55
10'	2 781	137	5 562
30'	7 206	274	11 836

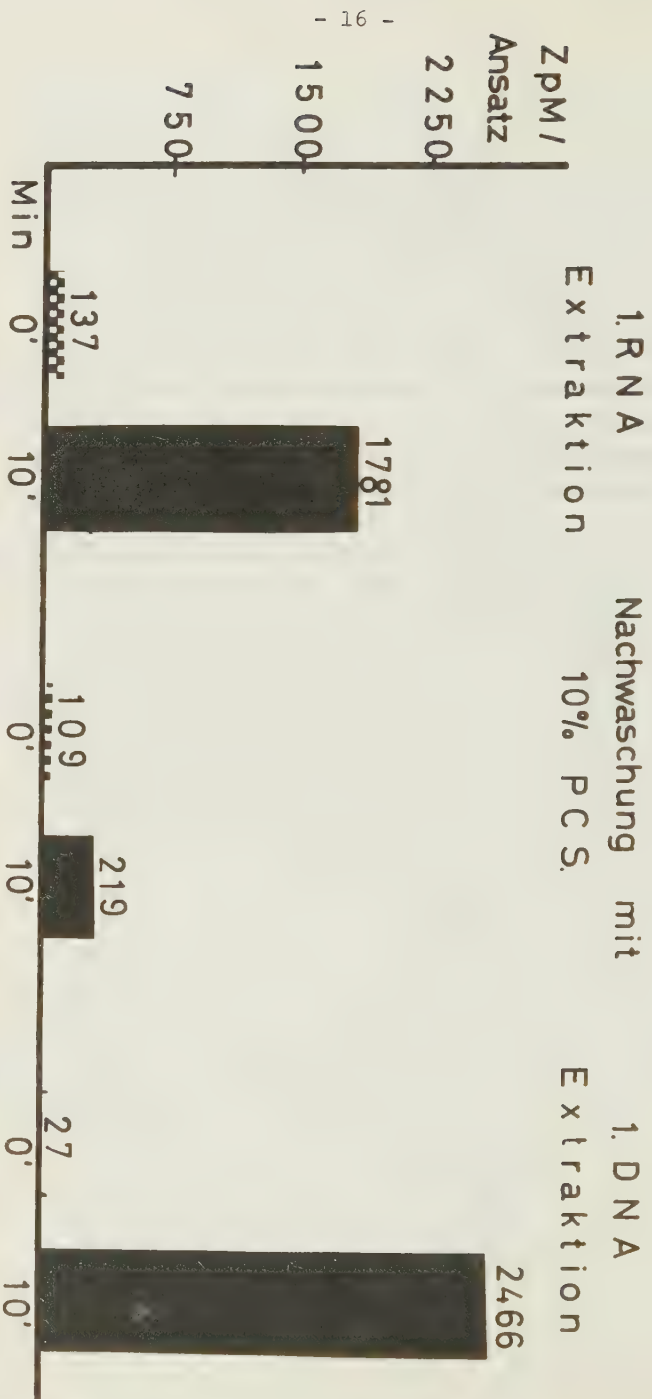
- 14 -

Die Mitochondrien wurden durch Differentialzentrifugation gewonnen ; Inkubationszeit 0' , 10' und 30' bei 37° C, pH 7,4, 0,5 mM dATP, dGTP, dCTP und TTP, 5 mM Mg^{++} , 1 $\mu C/ml$ dCMP- H^3 , Isolierung der RNA und DNA wie im experimentellen Teil beschrieben.

Dies rührt wahrscheinlich daher, daß das benutzte, käufliche dCMP - H^3 nicht ganz rein war und noch Spuren von Ribonukleotiden enthält, die unter den Versuchsbedingungen von einer gleichzeitig vorhandenen RNA - Polymerase in die RNA eingebaut werden. Mitochondrien enthalten eine ausreichende Menge an endogenen Ribonucleosid Triphosphaten, um einen solchen Einbau zu gestatten. Das Chromatogramm des dCMP - H^3 , das uns von der Firma gleichzeitig zugestellt wurde, ließ deutlich zwei Flecken erkennen, so daß die Möglichkeit bestätigt wird, daß der radioaktive Einbau in die RNA durch Verunreinigung des dCMP - H^3 verursacht wird.

Die mit dCMP - H^3 durchgeführten Versuche zeigten, daß mit isolierten Mitochondrien ein Einbau der Radioaktivität in die mitochondriale DNA nachgewiesen werden kann. Auch wenn in der gleichzeitig isolierten RNA regelmäßig ein meßbarer Einbau festgestellt werden konnte, so war doch die mitochondriale DNA höher markiert, wie in Abbildung 1 noch einmal schematisch wiedergegeben.

Einbau von dCMP-H³ in die RNA und DNA von Mitochondrien



- 16 -

Abb. 1 Versuchsbedingungen wie in Tabelle 2 angegeben. Es wurde eine etwas dünnere Mitochondrien-Suspension benutzt als in Tabelle 2

Diese Vorversuche gaben uns den ersten Anhaltspunkt darüber, daß dem gemessenem Einbau von dCMP-H³ in die mitochondriale DNA-Fraktion eine in den Mitochondrien lokalisierte DNA-Polymerase zugrunde liegen könnte.

Da dCMP-H³ keine direkte Vorstufe ist, lag es nahe, in den folgenden Versuchen eines von den in der DNS zu erwartenden Nucleosid-Triphosphaten als radioaktive Vorstufe zu verwenden. Es bot sich an, das für die DNA charakteristische Thymidin als H³-markiertes Thymidin-Triphosphat zu benutzen.

II. Einbau von TTP - H^3 in die DNA von Mitochondrien

Die folgenden Versuche wurden mit Mitochondrien-Fractionen durchgeführt, die zwecks weiterer Reinigung der Fraktion nach der üblichen Differentialzentrifugation noch einer Flotierung im Dichtegradienten unterzogen wurden, denn der Nachweis einer DNA - Polymerase - Aktivität in den Mitochondrien setzt Mitochondrien-Präparationen voraus, die vollkommen frei von Verunreinigungen mit Zellkernen und Zellkerntrümmern sind.

Isolierte, durch Gradientenzentrifugation hochgereinigte Mitochondrien, wurden mit Tritium markiertem Thymidin-Triphosphat in Gegenwart der nicht markierten Nucleotide dATP, dCTP und dGTP inkubiert. Durch einen ausgedehnten Waschprozeß wird die nicht eingebaute Radioaktivität vollständig entfernt, wie aus der 0-Zeitkontrolle der Tab. 3 zu ersehen ist. Wird die DNA anschließend nach der Methode von O g u r und R o s e n (1956) isoliert, so läßt sich in der mitochondrialen DNA-Fraktion Radioaktivität nachweisen. Aus Tab. 3 geht hervor, daß hochgereinigte isolierte Mitochondrien bei Anwesenheit aller anderen in der DNA zu erwartenden Nucleotide TTP - H^3 in die DNA von Mitochondrien einbauen. In der gleichzeitig isolierten RNA stellten wir keinen messbaren Einbau fest.

Der Nachweis des Einbaues von TTP - H^3 in die Mitochondrien - DNA gibt jetzt die Möglichkeit, den Einfluß von Pharmaka, von denen bekannt ist, daß sie mit DNA reagieren können, auf dieses System zu untersuchen.

Tab. 3 Einbau von TTP-H³ in die DNA von
Mitochondrien

	RNA (Zerfälle/Min.)	DNA (Zerfälle/Min.)
0-Zeit Kontrolle	0	0
kompl. Ansatz, 20'	7	1 151

Beispiel eines typischen Versuches.

Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation im Saccharose-Gradienten gereinigt. Inkubationszeit 20 Min. bei 37° C, 20 µC TTP-H³ (4,8 C/mmol)/ml, Isolierung der DNA und RNA nach O g u r und R o s e n .

III. Einbau von TTP-H³ durch nicht abgetrennte Kerne

Die Möglichkeit, daß Verunreinigungen der Mitochondrien-Fraktion mit Zellkernresten den Einbau von TTP-H³ in die Mitochondrien-DNA verursachen, konnte durch folgende Kriterien ausgeschlossen werden.

1.) Weitere Reinigung der Mitochondrien-Fraktion

Die durch Differentialzentrifugation gewonnenen Mitochondrien-Präparationen sind relativ rein. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten jedoch, daß vereinzelte Zellkernbruchstücke in diesen Fraktionen noch enthalten sind. Die Mitochondrien-Fraktionen wurden deshalb nochmals durch Flotierung in einem Saccharose-Gradienten gereinigt, wie im experimentellen Teil näher beschrieben. Derartige Mitochondrien-Präparationen enthalten nach den Untersuchungen von B a s s (1967) keine nachweisbaren Mengen an Zellkernen und Zellkernbestandteilen.

2.) Vergleich der spezifischen Aktivität in Mitochondrien und Zellkernen

Die Gegenüberstellung der spezifischen Aktivität in beiden Zellfraktionen ist ebenfalls ein starkes Argument gegen die Annahme einer Verunreinigung. Es zeigt sich eindeutig, daß unter gleichen Versuchsbedingungen die Mitochondrien-DNA sehr viel höher markiert ist als die Zellkern-DNA. Besonders deutlich wird der unterschiedliche Einbau, wenn die spezifische Aktivität angegeben wird, also die gemessenen ZpM auf µgDNA bezogen werden. Die genauen Daten sind aus Tabelle 4 ersichtlich.

Tab. 4

Einbau von TTP-H³ in die DNA von Mitochondrien
und Zellkernen

	Mitochondrien		Zellkerne	
	ZpM	ZpM/ μ gDNA	ZpM	ZpM/ μ gDNA
O-Zeit Kontrolle	0	0	0	0
kompl. Ansatz	1 030	5 150	862	33

Die Zellkerne wurden nach der Methode von W i d n e l l und T a t a isoliert, die Mitochondrien durch Flotation im Saccharose-Gradienten gereinigt, 15 Min. Inkubation bei 37°C, 20 μ C TTP-H³, pH 7,5 0,5 mM dATP, dGTP, dCTP, 5 mM Mg⁺⁺, 1 mM EDTA, Isolierung der DNA wie im experimentellen Teil beschrieben.

3.) Einfluß von DNase auf die Polymerase in Mitochondrien und Zellkernfraktionen

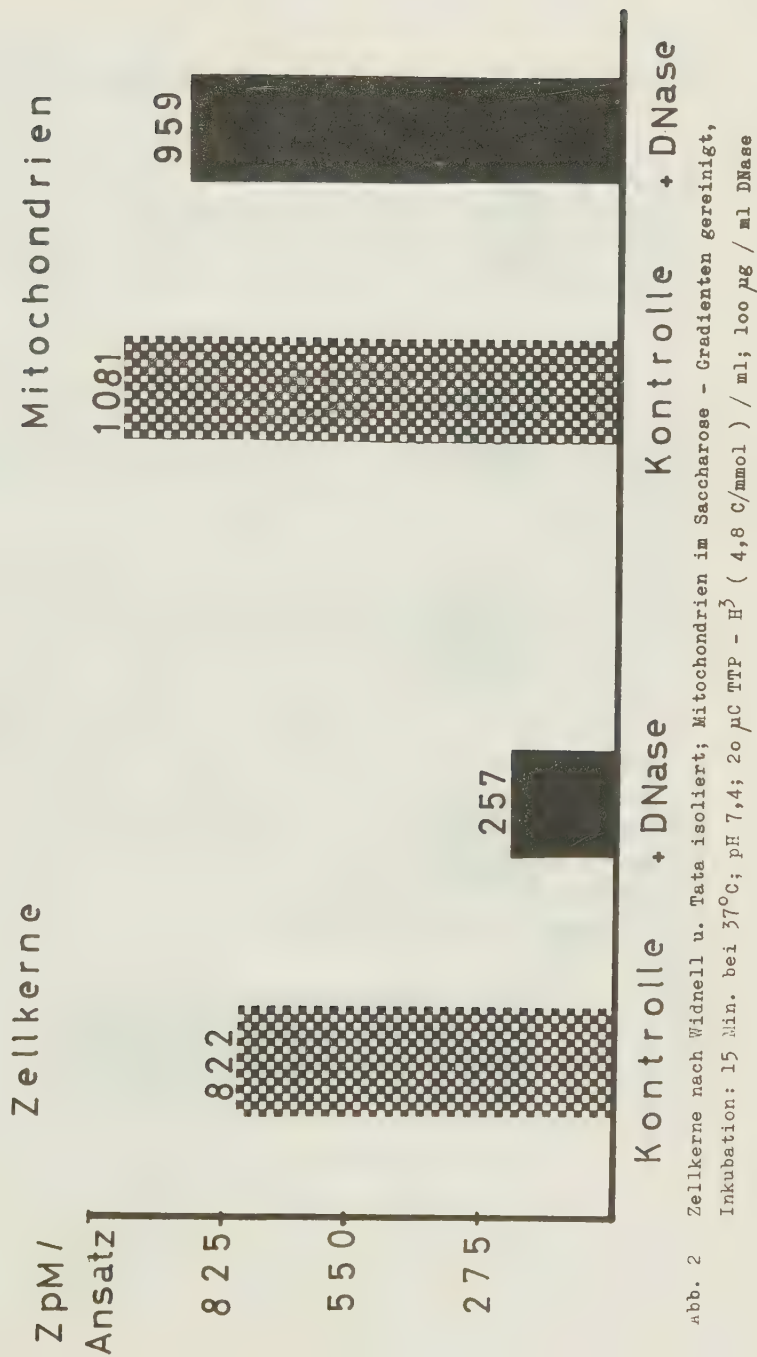
Wir konnten einen unterschiedlichen Einfluß von DNase auf die DNA-Polymerase-Aktivität in Mitochondrien und Zellkernen beobachten. Durch Zugabe von DNase zum Versuchsmedium wird ausschließlich die enzymatische Reaktion im Zellkern gehemmt. Das entsprechende System in den Mitochondrien bleibt durch DNase unbeeinflusst. Abbildung 2 gibt eine schematische Übersicht. Weitere Einzelheiten sind in Abschnitt V,2 beschrieben.

4.) Unterschiedliche Eigenschaften der DNA-Polymerase in Mitochondrien und Zellkernen

Wir stellten weiterhin fest, daß sich die mitochondriale DNA-Polymerase aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften von der entsprechenden enzymatischen Reaktion im Zellkern deutlich abgrenzen läßt. Eine zusammenfassende Gegenüberstellung der DNA-Polymerase-Aktivität beider Zellfraktionen wird in Abschnitt V gegeben.

Alle diese Befunde sprechen dafür, daß der Einbau von TTP-H^3 in die Mitochondrien-DNA nicht durch Verunreinigung mit Zellkernen oder Zellkerntrümmern verursacht sein kann.

Empfindlichkeit der DNA - Polymerase gegenüber DNase



IV. Eigenschaften der mitochondrialen DNA - Polymerase

Als nächstes versuchten wir zu klären, ob der radioaktive Einbau in die mitochondriale DNA tatsächlich eine DNA - Polymerase - Aktivität repräsentiert, d. h., ob alle typischen Eigenschaften einer DNA - Polymerase vorhanden sind, die von anderen Polymerasen bekannt sind.

1.) Anwesenheit aller vier d-Nucleotide

Eine DNA - Polymerase synthetisiert nach dem Modell der DNA unter Benutzung von Desoxynucleosid - Triphosphaten DNA. Bedingung für diese enzymatische Reaktion ist, daß alle vier in der DNA zu erwartenden d-Nucleotide gleichzeitig vorhanden sein müssen.

Bei der von uns untersuchten DNA - Polymerase in Mitochondrien konnten wir ebenfalls beobachten, daß deren maximale Aktivität an die Anwesenheit der vier d-Nucleotide gebunden ist. Fehlen die drei nicht markierten Nucleotide dATP, dCTP und dGTP im Ansatz, so läßt sich kaum noch ein Einbau von TTP - H^3 nachweisen. Bereits das Fehlen eines d-Nucleotides genügt, um die Einbau - reaktion nahezu vollständig aufzuheben. Dabei spielt es keine wesentliche Rolle, welches Nucleotid im Versuchsansatz weggelassen wird.

Dies geht aus den in der Abbildung 3 schematisch wiedergegebenen Ergebnissen hervor.

Abhängigkeit der DNA-Polymerase-Aktivität von der Anwesenheit nicht markierter Nucleosid-Triphosphate

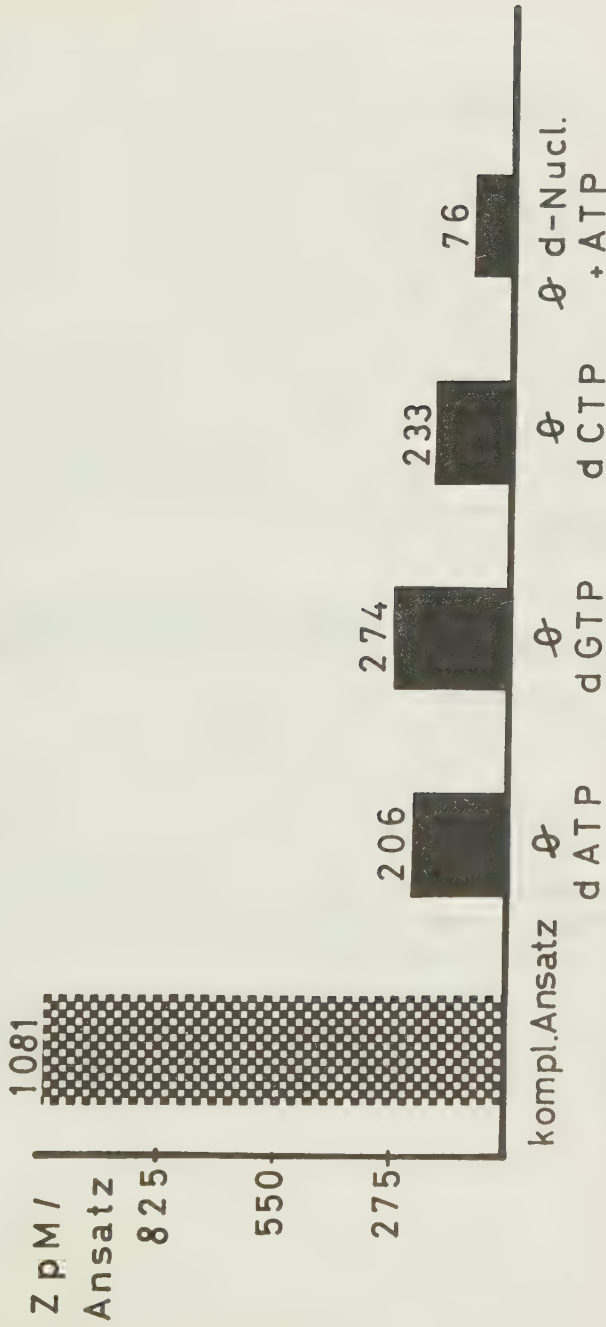


Abb. 3

Rattenleber - Mitochondrien wurden durch Zentrifugation im Saccharose - Gradienten gewonnen und 15 Min. bei 37°C mit 20 µC TTP - H³ / Ansatz bei pH 7,4 inkubiert. Der komplette Ansatz enthielt 0,5 mM dATP, dGTP, dCTP, 1 mM ATP.

2.) Abhängigkeit von Co - Faktoren

Von der RNA - Polymerase in Zellkernen und Bakterien ist bekannt, daß diese enzymatische Reaktion von zweiwertigen Kationen abhängig ist (L u c k und R e i c h , 1964). Wir konnten feststellen, daß die in den Mitochondrien lokalisierte DNA - Polymerase zur vollen Aktivität ebenfalls solche Co - Faktoren benötigt. Mit 5 mM Mg^{++} im Ansatz beobachteten wir eine maximale Aktivität der mitochondrialen DNA - Polymerase. Verwendeten wir anstelle von Mg^{++} 2 mM Mn^{++} , (bei einer höheren Konzentration fielen einige Substanzen aus dem Versuchsmedium aus), so ließ sich eine deutliche Verminderung der Einbaureaktion feststellen.

Tab. 5 Einfluß von zweiwertigen Kationen auf
den TTP - H^3 Einbau in die mitochondriale DNA

Inkubations - Zeit	5 mM Mg^{++} (ZpM)	2 mM Mn^{++} (ZpM)
0'	0	0
10'	1 068	589
30'	1 507	1 045

Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation im Saccharose Gradienten gewonnen; Versuchsbedingungen wie im experimentellen Teil beschrieben.

In Abschnitt V,5 wird noch einmal auf den unterschiedlichen Einfluß der Co - Faktoren auf die DNA - Polymerase - Aktivität in beiden Zellfraktionen eingegangen.

3.) Hemmung der enzymatischen Reaktion durch Antibiotica

Für eine DNA - Polymerase - Aktivität sind in jedem Falle das Fermentprotein und die DNA notwendig. Es sind Pharmaka bekannt, die diese enzymatische Reaktion zu hemmen vermögen (L e r m a n n , 1961, 1963; G o l d - b e r g und R e i c h , 1964; S c h w a r z et al. 1965; W a r d et al. 1965; L i e r s c h und H a r t m a n n , 1965; N e u b e r t , 1966).

Es handelt sich dabei um Antibiotica, deren Hemmwirkung an der DNA - Polymerase von R e i c h et al. 1964 näher untersucht wurde. Danach bilden die betreffenden Antibiotica mit der DNA Komplexe, und vermögen auf diese Weise die DNA abhängige Reaktion zu hemmen.

Durch Zusatz bestimmter Antibiotica zum Versuchsmedium untersuchten wir, ob der Einbau von TTP - H^3 in die mitochondriale DNA gehemmt wird. Wir stellten fest, daß die Antibiotica Nogalamycin, Cinerubin, Phleomycin und auch das Trypaflavin die von uns untersuchte enzymatische Reaktion in den Mitochondrien konzentrationsabhängig hemmten. Im Durchschnitt wurde mit 30 $\mu\text{g/ml}$ Nogalamycin, 50 $\mu\text{g/ml}$ Cinerubin bzw. 400 $\mu\text{g/ml}$ Phleomycin eine deutliche Hemmung erzielt.

Wir beobachteten, daß die Hemmung der enzymatischen Reaktion in den Mitochondrien nicht bei jedem Versuch mit den angegebenen Konzentrationen erreicht wurde. Dies läßt sich dadurch erklären, daß der DNA - Gehalt der Mitochondrien - Präparationen sicherlich nicht bei jedem Versuch konstant war, weil nicht jeweils eine genau gleiche Menge Mitochondrien eingesetzt wurde. Es ist bekannt, daß die Hemmung aber gerade von der Relation DNA zu Hemmstoff abhängig ist.

Tab. 6 Hemmung der mitochondrialen DNA-Polymerase
durch Antibiotica

Ansatz	ZpM
0 - Zeit Kontrolle	0
kompl. Ansatz	1 083
+ 400 µg/ml Phleomycin	369
+ 30 µg/ml Nogalamycin	178
+ 50 µg/ml Cinerubin	123
+ 30 µg/ml Trypaflavin	0

Als Precursor wurde TTP - H^3 (4,8 C/mmol)/ml benutzt;
die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation im
Saccharose - Gradienten gewonnen; Inkubationszeit 20'
bei 37° C ; pH 7,4; Versuchsansatz und Isolierung der
DNA wie in der Methode angegeben.

Auf Grund der angegebenen Untersuchungen kann die
Aussage gemacht werden, daß es sich bei der von uns
untersuchten enzymatischen Reaktion in den Mitochondrien
tatsächlich um eine DNA - Polymerase handelt, deren
maximale Aktivität an die Anwesenheit von Co - Faktoren
und aller vier in der DNA zu erwartenden d-Nucleotide
gebunden ist.

v. Gegenüberstellung der DNA - Polymerase - Aktivität
in Mitochondrien und Zellkernen

Da TTP - H^3 sowohl in die DNA von Zellkernen als auch in die Mitochondrien - DNA eingebaut wird, suchten wir nach weiteren Kriterien, um die mitochondriale DNA - Polymerase - Aktivität deutlich von entsprechenden Reaktionen im Zellkern abzugrenzen.

1.) Hemmung durch Antibiotica

Wie in Abschnitt IV,3 beschrieben, hemmen die Antibiotica Nogalamycin, Cinerubin, Phleomycin durch Blockierung der Matrize den TTP - H^3 Einbau in die Zellkern-DNA und mitochondriale DNA (T a n a k a et al. 1963; F a l a s h i et al. 1964; B h u y a n et al. 1965).

Wir untersuchten, ob bei gleicher Konzentration der Antibiotica die Hemmung der enzymatischen Reaktion in beiden Zellfraktionen von unterschiedlichem Ausmaß war. Es zeigt sich, daß die Hemmwirkung bei gleicher Konzentration der Hemmstoffe an der Mitochondrien - DNA - Polymerase stärker ausfällt, als bei dem entsprechenden Vorgang im Zellkern. Das ist nicht verwunderlich, denn das Verhältnis DNA zu Hemmstoff ist vermutlich für die Hemmung entscheidend. Da der Zellkern mehr DNA enthält als die Mitochondrien, wird die Relation DNA zu Hemmstoff beim Zellkern zuungunsten der Hemmung verschoben. Die genauen Daten sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tab. 7

Unterschiedliche Hemmwirkung des TTP - H^3 Einbaues in Mitochondrien- und Zellkern - DNA durch Antibiotica

	kompl. Ansatz		+ 50 μ g/ml Cinerubin	+ 30 μ g/ml Nogalamycin
	ZPM	ZPM/ μ g DNA	ZPM	ZPM/ μ g DNA
Zellkerne	862	33	506	19
Mitochondrien	1 030	5 150	123	619
			178	891

Die Zellkerne wurden nach der Methode von W i d n e l l und T a t a isoliert, die Mitochondrien durch Flotation im Saccharose - Gradienten gereinigt, 15 Min. Inkubation bei 37°C, pH 7,5, 5 mM Mg⁺⁺ 20 μ C TTP - H^3 (4,8 c/mmol)/ml, 0,5 mM dATP, dGTP, dCTP, 1 mM ATP, Isolierung der DNA wie im experimentellen Teil beschrieben.

2.) Einfluß von DNase

Wir suchten nach weiteren Faktoren, um die DNA - Polymerase - Aktivität in Mitochondrien von der in Zellkernen abzutrennen. Das Vorhandensein der Permeabilitätsbarriere, die durch die Mitochondrien-Membran gegeben ist, wird in den folgenden Versuchen ausgenutzt.

Durch Zusatz von DNase wurde die DNA - Polymerase - Aktivität ausschließlich im Zellkern gehemmt. Die enzymatische Reaktion in den Mitochondrien dagegen wird durch Zugabe von DNase zum Versuchsmedium nicht beeinflusst. Offenbar vermag das relativ große Fermentprotein nicht die Mitochondrien-Membran zu durchdringen und kann deshalb die Mitochondrien - DNA nicht erreichen.

DNase Zugabe, nach Extraktion der markierten DNA, bewirkt, daß die Radioaktivität aus der mitochondrialen DNA und Zellkern - DNA wieder freigesetzt wird.

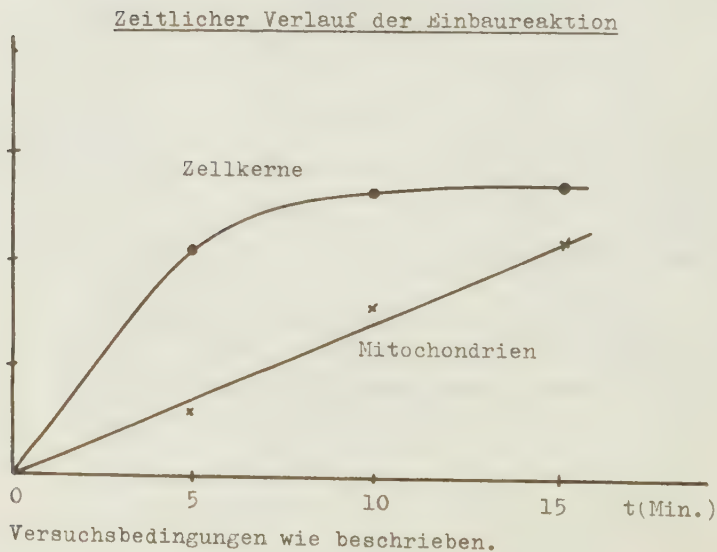
Tab. 8 Empfindlichkeit der DNA-Polymerase-Aktivität
in Mitochondrien und Zellkernen
gegenüber DNase

	<u>ohne DNase</u>		<u>+ DNase</u>	
	ZpM	ZpM/ μ g DNA	ZpM	ZpM/ μ g DNA
Zellkerne	862	33	233	9
Mitochondrien	1 030	5 150	905	4 520

20 μ C TTP - H^3 (4,8 C/mmol)/ml als Precursor,
Inkubationszeit 15 Min. bei pH 7,4, 37°C,
100 μ g/ml DNase, versuchsbedingungen siehe Methode.

3.) Zeitliche Abhängigkeit der Einbaureaktion

Als nächstes untersuchten wir die zeitliche Abhängigkeit der Nucleotid - Einbaureaktion in beiden Zellfraktionen. Bei parallelen Versuchsansätzen mit Zellkern - und Mitochondrien - Präparationen wurde die enzymatische Reaktion nach 5, 10, 15 und 20 Minuten Inkubation mit eiskalter 0,2 N Perchlorsäure unterbrochen. Vergleich man die Geschwindigkeit der Einbaureaktion in beiden Zellfraktionen miteinander, so zeigt sich, daß der Einbau von TTP - H^3 in die Mitochondrien - DNA über einen längeren Zeitraum linear verläuft, als bei dem entsprechenden Vorgang mit isolierten Zellkernen. Mit Mitochondrien - Präparationen ist die Reaktionsgeschwindigkeit mindestens 15 Minuten lang linear, hingegen läßt die enzymatische Reaktion mit Zellkernen bereits nach 5 Minuten keinen linearen Verlauf mehr erkennen.



4.) Einbau von Thymidin - H^3

Mit Ausnahme der Vorversuche, die wir mit dCMP - H^3 durchführten, verwendeten wir bei den bisher angegebenen Untersuchungen TTP - H^3 als radioaktiv markierte Vorstufe. Werden Mitochondrien - Präparationen mit Tritium - markiertem Thymidin inkubiert, so läßt sich in der isolierten mitochondrialen DNA ebenfalls Radioaktivität nachweisen. Dieser Einbau von Tdr - H^3 läßt sich nur dadurch erklären, daß Mitochondrien offenbar die Fähigkeit besitzen, Thymidin zu Thymidin - Triphosphat zu phosphorylieren. Zum Unterschied dazu, gelingt mit Zellkern - Präparationen kein Nachweis eines Einbaues von Thymidin - H^3 , so daß die Vermutung ausgesprochen werden kann, daß die Zellkerne über kein phosphorylierendes System verfügen. Abb. 5 zeigt den unterschiedlichen Einbau von Thymidin - H^3 in die Mitochondrien- und Zellkern-DNA.

Neuere Untersuchungen haben inzwischen ergeben, daß auch die Hyaloplasma - Fraktion bei Zugabe von DNA zum Versuchsansatz, einen Einbau von Thymidin - H^3 in die DNA dieser Zellfraktion katalysiert. Vermutlich sind es diese Hyaloplasma - Enzyme, die den Mitochondrien anhaften und das Thymidin zum Thymidin - Triphosphat phosphorylieren. Durch Zugabe von Hyaloplasma zu der Mitochondrien - Fraktion wird die Einbaureaktion von Thymidin - H^3 entsprechend höher.

Einbau von Thymidin - H³

in die DNA von Mitochondrien



Abb. 5

Die Zellfraktionen wurden wie im experimentellen Teil beschrieben isoliert und 15 Min. mit 100 µCi Tdr (6 C / mol) / ml bei pH 7,4 inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit Perchlorsäure ausgefällt und die DNA wie angegeben isoliert.

Tab. 9 Einbau von Thymidin - H^3 in die DNA
verschiedener Zellfraktionen

	Inkubationszeit	0'	15'
		ZpM	ZpM
Zellkerne		200	270
Mitochondrien		140	1 050
Hyaloplasma ohne DNA		205	219
Hyaloplasma + 30 μ g/ml DNA		200	1 214
Zellkerne + Hyaloplasma		219	678
Mitochondrien + Hyaloplasma		205	1 712

Die verschiedenen Zellfraktionen wurden wie in der Methode angegeben isoliert und mit 100 μ C Tdr (6 C/mol)/ml 15 Min. inkubiert. Versuchsbedingungen wie angegeben.

5.) Beeinflussung der Einbaureaktion durch Mg^{++} und Mn^{++}

Die maximale Aktivität der DNA - Polymerase in Mitochondrien und Zellkernen ist an die Anwesenheit von Co - Faktoren gebunden.

Tab. 10 Abhängigkeit des TTP - H^3 Einbaues
von zweiwertigen Kationen

	5 mM Mg^{++}		2 mM Mn^{++}	
	ZpM	ZpM/ μ g DNA	ZpM	ZpM/ μ g DNA
Zellkerne	2 466	94	10 877	416
Mitochondrien	1 109	5 544	599	3 000

Inkubation: 10 Min. bei 37°C, pH 7,4, 20 μ C TTP - H^3
(4,8 C/mmol)/ml, 5 mM Mg^{++} / Ansatz bzw. 2 mM Mn^{++} / ml

Wird bei Benutzung von Zellkern - Polymerase dem Versuchsmedium an Stelle von Magnesium Mangan zugesetzt, so läßt sich eine deutliche Steigerung der Einbaurrate in die Zellkern-Fraktion beobachten. Die Reaktionsgeschwindigkeit der mitochondrialen DNA - Polymerase ist in Gegenwart von 2 mM Mn^{++} eher geringer als bei 5 mM Mg^{++} .

Alle diese Befunde sprechen dafür, daß die in den Mitochondrien lokalisierte DNA - Polymerase von der DNA - Polymerase - Aktivität in Zellkernen verschieden ist.

VI. Versuche zur näheren Charakterisierung der DNA - Polymerase - Aktivität in Mitochondrien

Die DNA - Polymerase - Aktivität ist nur dann meßbar, wenn das Fermentprotein und die DNA gleichzeitig in einem Versuchsansatz enthalten sind. Durch Zugabe von exogener DNA zum Versuchsmedium, kann bei Verwendung isolierter Mitochondrien der Einbau von TTP - H^3 in die DNA dieser Zellorganellen noch etwas verstärkt werden.

Wir verwendeten für unsere Versuche käufliche Kalbsthymus - DNA in der Konzentration von 30 - 100 $\mu\text{g/ml}$. Die zugesetzte DNA-Menge soll dabei als Matrize für die Reaktion dienen.

Bei unseren Versuchen konnten wir bei Verwendung von Mitochondrien, die in Saccharose isoliert waren, durch Zusatz von 100 $\mu\text{g/ml}$ Kalbsthymus - DNA im Durchschnitt eine Erhöhung des TTP - H^3 - Einbaues in die Mitochondrien - DNA von etwa 40 % feststellen.

Die Stimulierung der mitochondrialen DNA - Polymerase durch exogene DNA war jedoch nicht in jedem Experiment in gleichem Ausmaße möglich. Dies ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, daß die DNA ganz sicher nicht die Fähigkeit besitzt, in die Mitochondrien hinein zu gelangen. Der Befund, daß trotzdem häufig eine gewisse Stimulierung des TTP - H^3 - Einbaues durch exogene DNA gefunden wurde, muß wohl so gedeutet werden, daß das Ferment während der Inkubation teilweise aus den Mitochondrien heraustritt und mit der exogenen DNA - Matrize reagiert.

Die bis jetzt beschriebenen Untersuchungen wurden mit "intakten - Gradienten - Mitochondrien" durchgeführt. Durch Vorbehandlung der " Gradienten - Mitochondrien" mit 1% Digitonin gelingt es, Mitochondrien zu fragmentieren. Es zeigt sich, daß auch "Digitonin-Partikel", d.h. kleine Fragmente von Mitochondrien, noch einen Einbau von TTP - H^3 in die DNA katalysieren. Offenbar enthalten diese Mitochondrien-Bruchstücke sowohl noch das Ferment als auch die DNA.

Wie erwähnt, sind für eine DNA-Polymerase-Aktivität in jedem Fall zwei Komponenten notwendig, einmal die DNA und zweitens das Fermentprotein. Da Voruntersuchungen gezeigt hatten, daß die DNA in den Mitochondrien fest mit der Struktur dieser Zellpartikel verbunden ist, andererseits von Zellkernen her bekannt ist, daß die Proteinkomponente möglicherweise löslich ist, wurde versucht, die beiden Komponenten in den Mitochondrien zu dissoziieren. Zu diesem Zweck wurden die Mitochondrien mit 1% Digitonin oder zweimal 30 sec. mit Ultraschall behandelt. Nach Abzentrifugieren der Mitochondrien-Membranen gewinnt man die klare lösliche "Supernatant Fraktion". Mit dieser löslichen Enzym-Fraktion, der Mitochondrien-Matrix, läßt sich allein kein Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen feststellen. Erst durch Zusatz von DNA zum Inkubationsmedium oder entsprechender Zugabe von Mitochondrien-Membranen kann ein Einbau von TTP - H^3 nachgewiesen werden. Somit ist offenbar eine Abtrennung des Fermentproteins von der Mitochondrien-DNA gelungen. (Tab.11)

Damit wird es möglich, das Fermentprotein zu isolieren, und die Eigenschaften der mitochondrialen DNA - Polymerase besser zu untersuchen.

Tab. 11 Einbau von TTP - H³ in die DNA
von

<u>Mitochondrien -</u>		<u>Mitochondrien</u>
<u>Membran - Fragmente</u>		<u>Matrix</u>
(Digitonin)		
ZpM		ZpM
8	0 - Zeitkontrolle	82
534	kompl. Ansatz	109
1 424	+ 100 µg/ml DNS	2 356

Versuchsbedingungen und Isolierung der Fraktionen wie beschrieben.

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, zu versuchen, eine DNA - Polymerase - Aktivität in Mitochondrien aus Warmblütergeweben nachzuweisen. Die mitgeteilten Ergebnisse zeigen, daß eine solche enzymatische Reaktion in isolierten Mitochondrien aus Rattenleber abläuft, und daß sie von entsprechenden vorgängen im Zellkern abgegrenzt werden kann.

Die Befunde stellen einen weiteren Beweis für eine von der Zellkern - DNA unabhängige Replikation mitochondrialer DNA dar.

D Zusammenfassung

1. Es wurden Methoden zur Messung einer DNA - Polymerase - Aktivität in isolierten Warmblüter - Mitochondrien ausgearbeitet. Entscheidend für die Bewertung der Versuche ist vor allem die Reinheit der Zellfraktionen.
2. Mit isolierten, hochgereinigten Mitochondrien - Präparationen aus Warmblüterzellen kann eine DNA - Polymerase - Aktivität nachgewiesen werden. Als Vorstufen wurden benutzt: H^3 - dCMP, H^3 - Tdr und H^3 - UTP.
3. Die mitochondriale Reaktion besitzt alle Charakteristica einer DNA - Polymerase - Reaktion:
 - a) Für eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit müssen alle vier nucleosid - Triphosphate gleichzeitig vorhanden sein.
 - b) Die Reaktion benötigt Mg^{++} und Mn^{++} Ionen.
 - c) Durch typische Hemmstoffe (Nogalamycin, Cinerubin, Phleomycin) kann die enzymatische Reaktion in den Mitochondrien beeinflußt werden.
4. Die mitochondriale Reaktion läßt sich von entsprechenden Vorgängen im Zellkern klar unterscheiden.
5. Es gelang, das mitochondriale Ferment in Lösung zu bringen und von der Mitochondrien - DNA abzutrennen.
Damit wird eine weitere Charakterisierung möglich.

E L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. BASS, R. Untersuchungen zur Reindarstellung enzymatisch aktiver Zellfraktionen aus Warmblütergeweben
Inaugural - Diss., Freie Universität Berlin, Med. Fakultät, (1967)
2. BASS, R.; HELGE, H. und NEUBERT, D. Untersuchungen über die Zellkern- und Mitochondrien-DNS nach Markierung mit H^3 - bzw. C^{14} -Thymidin
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 253, 20 (1966)
3. BHUYAN, B.K. and SMITH C.G. Differential interaction of Nogalamycin with DNA of varying base composition
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 566 (1965)
4. BURTON, K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid
Biochem. J. 62, 315 (1956)
5. CARNEO, G.; MOORE, C.; SANADI, D.R. GROSSMAN, C.S. MARMUR, J. Mitochondrial DNA in yeast and some mammalian species
Science 151, 687 (1966)
6. CHEVREMENT, M. Localization and synthesis of deoxyribonucleic acids in the cytoplasm of somatic cells of vertebrates: the role of mitochondria
Biochem. J. 85, 25 (1962)

7. FALASHI, A.; KORNBERG, A. Phleomycin, an inhibitor of DNA polymerase
Fed. Proc. 23, 940 (1964)
8. GOLDBERG, J.H. and REICH, E. Actinoycin inhibition of RNA synthesis directed by DNA
Fed. Proc. 23, 958 (1964)
9. GUTES, E. and GUTES, S. Thymidine incorporation by mitochondria in physarum polycephalum
Science 145, 1057 (1964)
10. HELGE, H. und NEUBERT, D. RNS- und DNS- Synthese in isolierten Mitochondrien und ihre Beeinflussung durch Pharmaka
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmac. 251, 113 (1965)
11. KORNBERG, A. Pyrophosphorylases and Phosphorylases in Biosynthetic reaction
Advanc. Enzymolog. 18, 191 (1957)
12. KROON, A.M. On the isolation and characterization of DNA from mitochondrial preparations
2. Kongr. Fed. Europ. Biochem. Soc. Wien, A 148 (1965)
13. LEHMANN, J.R.; BESSMAN, M.J.; SIMMS, E.S. and KORNBERG, A. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid
J. biol. Chem. 233, 163 (1958)
14. LERMANN, L. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines
J. molec. biol. 3, 18 (1961)
15. LERMANN, L. The structure of the DNA-Acridine complex
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 49, 94 (1963)

16. LIERSCH, M. und
HARTMANN, G. Die Bindung von Proflavin und
Actinomycin an DNS
Biochem. Z. 343, 16 (1965)

17. LUCK, D.J.L. and
REICH, E. DNA in mitochondrial of Neuro-
spora crassa
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)
52, 931 (1964)

18. NASS, S.; NASS, M.K.
and HENNIX U. Deoxyribonucleic acid in isolated
rat liver mitochondria
Biochim. biophys. Acta (Amst.)
95, 426 (1965)

19. NEUBERT, D. Vergleichende Untersuchungen über
die Nucleinsäuresynthese in Zell-
kernen und Mitochondrien und ihre
Beeinflussung durch Pharmaka
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp.
Path. Pharmacol. 253, 152 (1966)

20. NEUBERT, D. BASS, R.
und HELGE, H. Umsatzgeschwindigkeit der DNS in
Mitochondrien von Warmblüterzellen
Naturwissenschaften 53, 23 (1966)

21. NEUBERT, D.; OBERDISSE, E.; Solubilization and some properties
SCHMIEDER, M. und of vertebrate mitochondrial DNA
REINSCH, I. polymerase
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
348, 1709 (1967)

22. NEUBERT, D. HELGE, H.
BASS, R. Einbau von Thymidin in die Deoxy-
ribonucleinsäure von Mitochondrien
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp.
Path. Pharmacol. 252, 258 (1965)

23. NEUBERT, D. HELGE, H.
MERKER, H.J. Zum Nachweis einer RNS-Polymerase-
Aktivität in Mitochondrien tieri-
scher Zellen
Biochem. Z. 343, 44 (1965)

24. OGUR, M.; ROSEN, G. The nucleic acids of plant tissue
I. The extraction and estimation
of deoxypentose nucleic acid and
pentose nucleic acid
Arch. Biochem. 25, 262 (1950)
25. PLAUT, W.; SAGAN, L.A. Incorporation of thimidine in the
cytoplasm of *Amoeba proteus*
J. Biophys. biochem. Cytol.
4, 843 (1958)
26. POTTER, V.R.;
ELVEHJEM, C.A. A modified method for the study
of tissue oxidations
J. biol. Chem. 114, 494 (1936)
27. RABINOVITCH, M. and
PLAUT, W. Cytoplasmic DNA synthesis in
amoeba proteus
I. On the particulate nature of
the DNA-containing elements
J. Cell. Biol. 15, 525 (1962)
28. REICH, E. Actinomycin: Correlation of
Structure and Function of its
Complexes with Purines and DNA
Science 143, 684 (1964)
29. SCHACHMAN, H.K.
LEHMANN, J.R.
BESSMAN, M.J.
ADLER, J. SIMMS, E.S.
KORNBERG, A. Physical chemical characterization
of enzymatically synthesized DNA
Fed. Proc. 17, 304 (1958)
30. SCHATZ, G. HALSBRUNNER, E.
TUPPY, H. Deoxyribonucleic acid associated
with yeast mitochondria
Biochem. biophys. Res. Commun.
15, 127 (1964)
31. SCHATZ, G. HALSBRUNNER, E.
TUPPY, H. Intramitochondriale Deoxyribonuclein-
säure in Säugetierzellen
Monatshefte f. Chemie 95, 1135 (1964)

32. SCHWARZ, H.S.
SODERGREN, J.E.
GAROFALO, M. and
STEMBERG, S.S.
Actinomycin D - Effects on nucleic acid and protein metabolism in intact and regenerating liver of rats
Cancer Res. 25, 307 (1965)
33. STONE, G.E. and
MILLER, O.L.
Incorporation of tritiated thimidine into deoxyribonuclease-sensitive material in mitochondria of tetrahymena
J. Cell. Biol. 23, 89a (1964)
34. TANAKA, N.
YAMAGUCHI, H.
UMEZAWA, H.
Mechanism of action of phleomycin a tumor inhibitory antibiotic
Biochem., biophys. Res. Commun. 10, 171 (1965)
35. TEWARI, K. JAYARAMAN, J.
MAHLER, H.R.
Separation and characterization of mitochondrial DNA from yeast
Biochem., biophys. Res. Commun. 21, 141 (1965)
36. WARD, D.C. REICH, E.
and GOLDBERG, J.H.
Base specificity in the interaction of Polynucleotides with Antibiotic Drugs
Science 149, 1259 (1965)
37. WATSON, J.E. and
CRICK, F.H.C.
A Structure for Deoxyribose Nucleic Acids
Nature (London) 171, 737 (1953)
38. WIDNELL, C.C. and
TATA J.R.
A procedure for the isolation of enzymically active rat-liver-nuclei
Biochem. J. 92, 313 (1964)
39. WINTERSBERGER, E.
Occurrence of a DNA-Polymerase in isolated yeast mitochondria
Biochem., biophys. Res. Commun. 25, 1 (1966)
40. WOLLGIEHE, R. and
MOTHEIS, K.
Über die Incorporation von H^3 - Thymidin in die Chloroplasten - DNS von Nicotiana-rustica
Exp. Cell Res. 35, 52 (1964)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Herken
und Herrn Prof. Dr. Neubert meinen aufrichtigen
Dank aussprechen für die Überlassung des Themas
und die freundliche Unterstützung bei der Durch-
führung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 21. Mai 1941 wurde ich, Monika Martha Schmieder, als zweite Tochter des Ingenieurs Fritz Schmieder und seiner Ehefrau Marga, geb. Schubert, in Dresden geboren.

1947 wurde ich in Dresden eingeschult. Im Januar 1953 zogen wir nach West-Berlin. Hier besuchte ich das Lessing-Gymnasium in Berlin-Reinickendorf. Nach bestandener Reifeprüfung 1960, wurde ich im Mai desselben Jahres an der Freien Universität Berlin für das Fach Zahnmedizin immatrikuliert.

Nach fünfsemestrigem Studium bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung am 29. 10. 1962 in Berlin. Das zahnärztliche Staatsexamen bestand ich am 30. Juli 1965 an der Freien Universität Berlin. Nach einjähriger Assistenzzeit in einer zahnärztlichen Praxis, war ich für ein Jahr als wissenschaftliche Assistentin in der konservierenden Abteilung der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Freien Universität Berlin tätig. Seitdem arbeite ich in einer zahnärztlichen Praxis.

